棉铃虫齿唇姬蜂嗅觉受体基因 *CchlOrco* 的克隆及组织表达谱分析

董钧锋[1], 宋月芹[1], 孙九光[2], 闫志宁[1], 孙亚兰[3], 王琛柱[3,*]

(1. 河南科技大学林学院, 河南洛阳 471003; 2. 安阳工学院生物与食品工程学院, 河南安阳 455000; 3. 中国科学院动物研究所, 农业虫害鼠害综合治理研究国家重点实验室, 北京 100101)

摘要:【目的】昆虫的嗅觉受体(olfactory receptors, ORs)一般以气味分子特异的 ORs 与共受体(co-Receptor, Orco)通过形成异质二聚体在嗅觉感受中发挥关键作用,其中 Orco 由于具有序列的保守性而受到广泛的重视。本研究旨在克隆棉铃虫齿唇姬蜂 *Campoletis chlorideae* 的 Orco 基因,并对其组织表达谱进行分析。【方法】利用 RT-PCR 技术和转录组分析技术克隆棉铃虫齿唇姬蜂的 Orco 基因,并对其编码的氨基酸序列进行生物信息学分析;利用 Real-time PCR 技术对该基因在该蜂成虫不同组织中的表达量进行分析。【结果】获得了棉铃虫齿唇姬蜂 *Orco* 的全长 cDNA 序列,命名为 *CchlOrco*(GenBank 登录号:KP255444)。序列分析表明, 该基因开放阅读框全长 1 437 bp,编码 478 个氨基酸,预测该氨基酸序列具有 7 个跨膜区。*CchlOrco* 主要在成虫触角中表达,且在雄蜂触角中的表达量最高,是雌蜂触角中表达量的 8.0 倍,而在其他组织中表达量极低。【结论】本研究克隆了棉铃虫齿唇姬蜂 *CchlOrco* 序列全长,明确了其在成虫不同组织中的表达水平,为进一步研究该基因及其他嗅觉受体基因功能奠定了基础。

关键词: 棉铃虫齿唇姬蜂; 嗅觉受体; 基因克隆; 组织特异性; 荧光定量 PCR

中图分类号: Q966　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 0454-6296(2015)06-0603-07

Cloning and tissue expression profiling of the olfactory receptor gene *CchlOrco* in *Campoletis chlorideae* (Hymenoptera: Ichneumonidae)

DONG Jun-Feng[1], SONG Yue-Qin[1], SUN Jiu-Guang[2], YAN Zhi-Ning[1], SUN Ya-Lan[3], WANG Chen-Zhu[3,*] (1. Forestry College, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471003, China; 2. Biology and Food Engineering College, Anyang Institute of Technology, Anyang, Henan 455000, China; 3. State Key Laboratory of Integrated Management of Pest Insects and Rodents, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract:【Aim】Olfactory receptors (ORs) interact with the co-receptor (Orco) to form heterodimeric complexes that are critical for insect olfaction. Due to its highly conserved sequence, Orco has received extensive attention. The present study aims to clone and identify the Orco gene in *Campoletis chlorideae*, and analyze its tissue expression profiles.【Methods】The Orco gene from *C. chlorideae* was cloned by RT-PCR and transcriptome technology, and the putative amino acid sequence was analyzed by bioinformatics methods. The expression level of *Orco* in different tissues of *C. chlorideae* adults was analyzed by real-time quantitative PCR.【Results】The full-length cDNA sequence of *Orco* was obtained from *C. chlorideae*, and named as *CchlOrco* (GenBank accession no. KP255444). Sequence analysis revealed that the open reading frame of *CchlOrco* is 1 437 bp in length, encoding 478 amino acid residues with seven transmembrane domains. Real-time quantitative PCR results indicated that *CchlOrco* was mainly expressed in the adult antennae of *C. chlorideae*, while expressed in other tissues at an extremely low level. The expression level of *CchlOrco* in the antennae of male adults was 8.0-fold as high as that in the

基金项目: 国家重点基础研究发展规划("973"计划)项目(2013CB127600); 农业虫害鼠害综合治理研究国家重点实验室开放课题(ChineseIPM1306)

作者简介: 董钧锋, 男, 1973 年生, 河南许昌人, 博士, 副教授, 研究方向为农业昆虫与害虫防治, E-mail: junfengdong@haust.edu.cn

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: czwang@ioz.ac.cn

收稿日期 Received: 2015-01-04; 接受日期 Accepted: 2015-04-27

antennae of female adults. 【Conclusion】The cloning of the full-length olfactory receptor gene *CchlOrco* and its expression profiles provide a basis for future functional study of *CchlOrco* and other olfactory receptor genes of *C. chlorideae*.

Key words: *Campoletis chlorideae*; olfactory receptor; gene cloning; tissue-specific expression; real-time quantitative PCR

嗅觉在昆虫取食、求偶、产卵和躲避外界不良环境等方面起着至关重要的作用,直接关系到昆虫本身的生存和物种的繁衍。昆虫对气味的识别过程非常复杂,外界气味分子首先与相应的气味结合蛋白(odorant binding proteins, OBPs)结合,穿过细胞间的淋巴液,最后到达嗅觉感受器中的感觉神经元,位于其上的嗅觉受体(olfactory receptors, ORs)被识别和激活后,产生嗅觉神经冲动,从而做出一系列的行为反应(Vogt and Riddiford, 1981; Steinbrecht, 1997; Hallem *et al*., 2004; 王桂荣等, 2004),因此嗅觉受体在气味的识别过程中发挥极其重要的作用。自 1999 年从黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 中鉴定出第一个昆虫嗅觉受体以来(Vosshall *et al*., 1999),已经从鳞翅目(Qiao *et al*., 2010; 葛星等, 2013)、鞘翅目(陈全森等, 2010)、双翅目(Pitts *et al*., 2004; 申建梅等, 2011)和膜翅目(张帅等, 2009)等多种昆虫中鉴定出数百个嗅觉受体。这些昆虫嗅觉受体分为传统型嗅觉受体(conventional ORs)和嗅觉受体共受体(olfactory receptor co-receptor, Orco)(Krieger *et al*., 2003; Benton *et al*., 2006)。前者在不同昆虫中高度变异,序列一致性低,后者在不同昆虫间具有较高的保守性。昆虫嗅觉受体是 G 蛋白偶联受体,都有 7 个跨膜区域,但其结构特点与哺乳动物的 G 蛋白偶联受体刚好相反,N 端在细胞膜内,C 端在细胞膜外(Benton *et al*., 2006; Lundin *et al*., 2007; Smart *et al*., 2008)。Orco 最早在黑腹果蝇中被命名为 Or83b,在家蚕 *Bombyx mori* 中被命名为 Or2,在冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* 和埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 中被命名为 Or7,后来被重新命名为 Orco(Vosshall and Hansson, 2011)。Orco 不与气味配体直接结合,而是与 ORs 形成 Or-Orco 异质二聚复合体,协同行使功能。Orco 被认为用来促进 ORs 在神经元树突上的定位并维持其稳定性,提高 ORs 对气味分子反应的效率(Larsson *et al*., 2004; Sakurai *et al*., 2004; Smart *et al*., 2008; 乔奇等, 2008)。

棉铃虫齿唇姬蜂 *Campoletis chlorideae* 是棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 和烟青虫 *Helicoverpa assulta* 的优势寄生蜂,在中国、韩国和印度等棉铃虫危害极其严重的国家倍受关注(Nandihalli and Lee, 1995; Pandey *et al*., 2004)。目前以 Orco 为靶标的害虫防治方法取得了一定进展(Chen and Luetje, 2012; Jones *et al*., 2012),但由于 Orco 结构和功能在不同昆虫间高度保守,以 Orco 为靶标防治害虫的同时,也可能会对非靶标昆虫和天敌造成不利影响。因此,对一些天敌昆虫进行嗅觉相关基因方面的研究已经迫在眉睫。本文根据转录组信息,克隆了棉铃虫齿唇姬蜂的 Orco 基因,并利用荧光定量 PCR 技术,对该基因在棉铃虫齿唇姬蜂成虫不同组织中的表达情况进行了研究。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

棉铃虫齿唇姬蜂于 2013 年 6 月采自河南许昌郊区烟田,室内饲养条件参考刘万学等(2004):温度 25 ± 0.5℃,相对湿度 70% ± 10%,光周期为14L∶10D,成虫以 20% 蜂蜜水补充营养。寄主棉铃虫采自洛阳郊区番茄田,在河南科技大学林学院实验室用人工饲料继代饲养。

1.2 试剂

总 RNA 提取试剂 RNAiso™ Plus、反转录试剂盒、pMD19-T 载体和 SYBR® Premix Ex Taq™ II 荧光定量试剂等分子生物学试剂均购自 TaKaRa 公司。PCR 引物合成和测序工作均由北京奥科鼎盛生物科技有限公司完成。

1.3 总 RNA 的提取和第一链 cDNA 的合成

选取棉铃虫齿唇姬蜂 3 日龄成虫为实验材料,分别取雌雄触角、头(去掉触角)、胸、腹、足和翅,并立即放入液氮中冷冻,-80℃保存备用,每个样品重复 3 次。

根据 RNAiso™ Plus 试剂说明书提取棉铃虫齿唇姬蜂不同组织的总 RNA,经 DNase 消化酶去除污染的 DNA,并电泳和 Nanodrop 检测。第一链 cDNA 的合成参照反转录试剂盒说明书进行,获得的第一链 cDNA 保存于 -20℃冰箱中。

1.4 Orco 基因的克隆与鉴定

根据中国科学院动物研究所实验室测定的棉铃

虫齿唇姬蜂触角转录组数据，利用引物设计软件 Primer 5.0 设计棉铃虫齿唇姬蜂 Orco 基因的特异引物，以反转录合成的第一链 cDNA 为模板，PCR 的反应体系为20 μL：cDNA 模板 1 μL，10 × Ex Taq 缓冲液 2 μL（含 Mg^{2+}），2.5 mmoL/L dNTPs 1.6 μL，Ex Taq DNA 聚合酶 0.2 μL，上游和下游引物各 0.8 μL（10 μmoL/L），灭菌水 13.6 μL。反应条件：95℃ 预变性 3 min；然后 95℃ 变性 30 s，50℃ 退火 30 s，72℃ 延伸 30 s，进行 35 个循环；最后 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物经 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

表 1　本研究所用引物名称及序列

Table 1　The primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列（5′-3′） Primer sequences	引物用途 Use of primers
CchlOrco-F	GCCTCAAGATGATGAAGTTCA	cDNA 克隆
CchlOrco-R	CAGACGTTGTATTCACTTCAG	cDNA cloning
CchlOrco-RTF	GACCAACTGCTGGCACTCAAT	实时荧光
CchlOrco-RTR	GTTATGGTGGTGATCAACATGTG	定量 PCR
CchlActin-F	CCGAGTTGCACCTGAAGAAC	Real-time
CchlActin-R	ACGACCAGAAGCGTAGAGAG	quantitative PCR

1.5　PCR 产物的回收、克隆和测序

按照 TaKaRa 胶回收试剂盒对 PCR 产物进行回收，将回收产物连接到 pMD19-T 载体上，并转化到大肠杆菌 DH5α 感受态细胞中，涂平板过夜培养，次日挑取阳性单克隆菌落，在 LB 液体培养基中振荡过夜培养后进行测序验证。

1.6　序列分析

利用 BLAST 在线工具（http://blast.ncbi.nlm.nih.gov）进行序列相似性比对；序列分析用 DNAMAN 软件进行；用在线工具 TMHMM（http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM）进行跨膜区域预测；利用 MEGA6.0 软件中的 Neighbor-Joining 方法进行 1 000 次重复构建系统进化树。

1.7　荧光定量 PCR

根据 1.6 节中获得的测序结果设计棉铃虫齿唇姬蜂 Orco 基因特异性引物，用于不同组织荧光定量 PCR 的测定。同时根据其他物种的 *β-actin* 基因保守区设计简并引物，获得棉铃虫齿唇姬蜂的内参基因 *β-actin* 部分序列，根据此序列设计特异引物，用于荧光定量 PCR 的内参基因测定，所有引物详细信息见表 1。

相对定量在 Bio-Rad CFX96™ Real-time PCR 检测系统上进行，设置 3 次重复。荧光定量体系 20 μL，分别为：SYBR II 10 μL，正反向引物（10 μmoL/L）各 0.8 μL，cDNA 模板 2 μL，灭菌水 6.4 μL。反应条件为：95℃ 预变性 30 s；95℃ 变性 5 s，53℃ 退火 30 s，72℃ 延伸 30 s，进行 40 个循环。以棉铃虫齿唇姬蜂雌蜂触角中 *CchlOrco* 基因的表达量为基准，研究该基因在不同组织中的表达情况，利用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 进行数据分析（Livak and Schmittgen，2001）。

2　结果

2.1　棉铃虫齿唇姬蜂 Orco 基因序列分析

棉铃虫齿唇姬蜂 Orco 基因开放阅读框全长为 1 437 bp，编码 478 个氨基酸，预测分子量为 53.79 kD，等电点为 8.0，将该基因命名为 *CchlOrco*（GenBank 登录号：KP255444）。

利用 TMHMM2.0 软件对 *CchlOrco* 编码蛋白跨膜结构进行分析，发现此受体序列具有 7 个 α 螺旋跨膜区，跨膜区氨基酸的位置分别是第 41 - 63，73 - 93，132 - 154，186 - 205，350 - 372，382 - 404 和 452 - 478 位，并且该序列的 N 端在细胞膜内（图 1）。将此序列与其近缘种昆虫 Orco 受体序列对比，发现棉铃虫齿唇姬蜂 Orco 与普通麦茎蜂 *Cephus cinctus* 的 Orco 氨基酸序列一致性最高，为 84.62%；其次是与东方蜜蜂 *Apis cerana*、东方大黄蜂 *Bombus impatiens* 和中红侧沟茧蜂 *Microplitis mediator*，Orco 序列一致性分别为 81.21%，81.21% 和 81.17%；与棉铃虫齿唇姬蜂寄主棉铃虫的 Orco 序列一致性也高达 65.15%，并且在其 C 端都具有一个高度保守的区域（图 2）。为了明确棉铃虫齿唇姬蜂 Orco 氨基酸序列与其他目昆虫之间的进化关系，对来自 4 个目的 89 种昆虫的 Orco 氨基酸序列进行同源性比较分析，构建系统进化树（图 3），结果发现，来自 4 个目的昆虫集聚成两大簇，鳞翅目为一簇，膜翅目、双翅目和鞘翅目聚为一簇，而且膜翅目与鞘翅目又集聚到下一级分支的同一簇，说明膜翅目与鞘翅目的亲缘关系更近。

2.2　棉铃虫齿唇姬蜂 *CchlOrco* 基因在成虫不同组织中的表达情况

以棉铃虫齿唇姬蜂雌蜂触角中 *CchlOrco* 基因的表达量为基准，研究该基因在不同组织中的表达情况。Real-time PCR 结果表明，*CchlOrco* 主要在成虫触角中表达，并且其在雄蜂触角中的表达量最高，是在雌蜂触角中表达量的 8.0 倍；*CchlOrco* 在足和翅中也有少量表达，在雌蜂足和翅中表达量分别是在雌蜂触角中表达量的 0.0022 倍和 0.0055 倍，在雄蜂足和翅中的表达量分别是在雌蜂触角中表达量的 0.0042 倍和 0.0007 倍；*CchlOrco* 在雌雄蜂胸部的表达量更

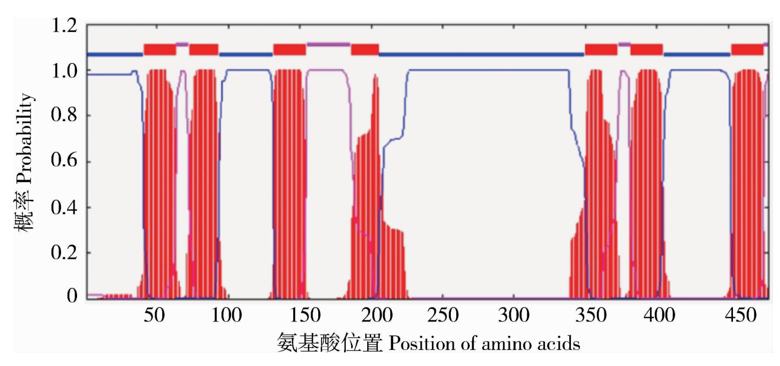


图 1 棉铃虫齿唇姬蜂嗅觉受体蛋白 Orco 的跨膜结构预测

Fig. 1 Predicted transmembrane domain of the olfactory receptor corecptor (Orco) from *Campoletis chlorideae*

```
AcerOrco  .MMKFKQQGLIADLMPNINLMKATGHFMFNYYTDS..STKHIHKIYCIVHLVLIIMQFGFCGINLMMESDDVDDLTANTITMLFFTHSVVKLVYFAVRSK   97
AfloOrco  ..MKFKQQGLIADLMPNINLMKATGHFMFNYYTDS..STKHIHKIYCIVHLVLIIMQFGFCGINLMMESDDVDDLTANTITMLFFTHSVVKLVYFAVRSK   96
BimpOrco  .MMKFKQQGLVADLMPNIRLMKATGHFLFNYYTDN..STKNIHRIFAIVHLVLMLMQFGFCGINLFFEKEDVDDLTANTITMLFFTHSVIKVVYFAVRSK   97
CchlOrco  .MMKFKQQGLVSDLMPNIRLMQISGHFMFNYYADG...MKFMHKIYCVVHLVLVLVQFGLCLVNMALESGDVDDLTANTITVLFFAHSIVKIGYFAVRSK   96
CcinOrco  .MMKFKQQGLVADLMPNIRHMQFSGHFMFNYYNDTGGSTKLFHTIYCSIHLFLILLQFGLCCVNLTLERADVDDLTANTITVLFFAHSIIKLAYFAVRSK   99
HarmOrco  MMTKVKAQGLVSDLMPNIKLMQMAGHFLFNYHSENAGMSNLLRKIYASTHAILIFIHYACMGINMAKYSDEVNELTANTITVLFFAHTIIKLAFFALNSK  100
MmedOrco  .MMKTKHQGLVADLMPNIRLMQISGHFMFNYYGEG...KKLMHKIYCSVHLFLILLQFGFVAINLVKEKEDVDDLTANTITILFFLHTLIKIVYFAARSK   96
NvitOrco  .MMKMKQQGLVADLLPNIRVMQGVGHFMFNYYSEG...KKFPHRIYCIVTLLMLIMQYGMMAVNLMMESDDVDDLTANTITMLFFLHPIVKMIYFPVRSK   96

AcerOrco  LFYRTIGIWNNPNSHPLFAESNARYHQIAVKKMRILLLAVIGTTVLSAISWTTITFIGDSVKKVIDPVTNETTYVEIPRLMVRSWYPYDPSHGMAHILTL  197
AfloOrco  LFYRTIGIWNNPNSHPLFAESNSRYHQIAVKKMRILLLAVIGTTVLSAISWTTITFIGDSVKKVIDPVTNETTYVEIPRLMVRSWYPYDPSHGMAHILTL  196
BimpOrco  LFYRTIGIWNNPNSHPLFAESNARYHQVAVRKMRILLLAVLATTMLSAISWTSITFIGDSVKKVIDPITNETTYVEIPRLMLRSWYPYNASHGMAHILTL  197
CchlOrco  LFYRTIAIWNNPNSHPLFAESNARYHAIALTKMRRLLFAVSGATILSVLCWTGITFVGDSVKKVVDPVTNETTMVEIPRLMLRSYYPFDASHGMAHILTL  196
CcinOrco  LFYRTIGIWNNPNSHPLFAESNARYHAIALTKMRRLLAAVGAATILTVCAWTGITFVGDSVKKVTDPVTNETMTVEIPRLMLRSWYPYDASHGMAHVLTL  199
HarmOrco  SFYRTIAVWNQSNSHPLFTESDARYHQIALTKMRRLLYFICGMTVLSVISWVTLTFFGESVRMVTNKETNETLTEVVPRLPLKAWYPFNAMSGTMYIVAF  200
MmedOrco  LFYRTIAIWNNPNSHPLFAESNARYHSIALTKVRRLLFCVGAATVATTISWTTLTFFEDPHVERLNKETNETYIEEIPRLLVRSWYPFDARHGVAHIGML  196
NvitOrco  IFYKTIAIWNNPNSHPLFAESNARFHALAITKMRRLLFCVAGATIFSVISWTGITFVDESVKRIVDPETNETTIIPIPRLMIRTFYPFNAMSGAGHVFAL  196

AcerOrco  IFQFYWLIFCMADANLLDVLFCSWLLFACEQIQHLKNIMKPLMEFSATLDTVVPNSGELFKAGSAEQPKEQEP.LPPVTPPQ.GENMLDMDLRGIYSNRT  295
AfloOrco  IFQFYWLIFCMADANLLDVLFCSWLLFACEQIQHLKNIMKPLMEFSATLDTVVPNSGELFKAGSAEQPKEQEP.LPPITPPQ.GENMLDMDLRGIYSNRT  294
BimpOrco  IFQFYWLVFCMADANLLDVLFCSWLLFACEQIQHLKNIMKPLMEFSATLDTVVPNSGELFKSGSAEQPRDHDP.LPPTTPTAPGENMLDMDLRGIYSNRT  296
CchlOrco  VYQFYWLVFTMFDANSIDVLFCSWLLFACEQLQHLKQIMKPLMELSATLDTVVPNSNELFKAGSAEHLRDNSNNVQPPPSAQ.GENMLDLDLRGIYSNRQ  295
CcinOrco  IYQFYFLLITTMDANSLDVLFCSWLLFACEQLQHLKQIMKPLMELSATLDTVVPHTNELFKAGSTDHLRDTQG.TQPMAPPP.NENMLDMDLRGIYSNRQ  298
HarmOrco  AFQVYWLLFSMAIANLMDVMFCSWLIFACEQLQHLKAIMKPLMELSASLDTYRPNTAELFRASSTEK.SEKIP............DTVDMDIRGIYSTQQ  287
MmedOrco  IYQIYWLFICTVDANSIDVLFCSWLLFACEQLQHLKAIMKPLMELSATLDTVVPNSGELFKAGSADHLRDNDG..VPAEPAMNGDNMLDMDLRGIYSNRQ  294
NvitOrco  IYQFYYLIISMAISNSLDVLFCSWLLFACEQLQHLKAIMKPLMELSATLDTVVPNSGELFKAGSADHLRDSQG....VQPSGNGDNVLDVDLRGIYSNRQ  292

AcerOrco  DFTTTFRPTAGMTFNGG...VGPNGLTKKQEMLVRSAIKYWVERHKHIVRLVTAIGDAYGVALLLHMLTTTITLTLLAYQATKIHAVDTYAASVVGYLLY  392
AfloOrco  DFTTTFRPTAGMTFNGG...VGPNGLTKKQEMLVRSAIKYWVERHKHIVRLVTAIGDAYGVALLLHMLTTTITLTLLAYQATKIHAVDTYAASVVGYLLY  391
BimpOrco  DFTATFRPTAGMTFNGG...VGPNGLTKKQEMLVRSAIKYWVERHKHIVRLVTAIGDAYGVALLLHMLITTITLTLLAYQATKINAVDTYAASVIGYLLY  393
CchlOrco  DFTATFRPTAGTQFNGG...VGPNGLTKKQEMLVRSAIKYWVERHKHVVRLVTAIGDAYGFALLLHMLITTITLTLLAYQATKVNSVDVYAATTIGYLLY  392
CcinOrco  DFTATFRTAAGMNFNGG...VGPNGLTKKQEMLVRSAIKYWVERHKHIVRLVTAIGDAYGVALLFHMLITTVSLTLLAYQATKVNTVDVYAATVIGYVLY  395
HarmOrco  DFGMTLRGAGGRLQNFGQQNPNPNGLTPKQEMLARSAIKYWVERHKHVVRLVASIGDTYGTALLFHMLVSTITLTLLAYQATKINGINVYAFSTIGYLSY  387
MmedOrco  DFTATFRPTAGTQYNGG...VGPNQLTKKQEMLVRSAIKYWVERHKHIVRLVTAIGDAYGVALLFHMLITTITLTLLAYQATKVNGVNVYAASTIGYLLY  391
NvitOrco  DFTATFRPTAGTTFNGG...VGPNGLTKKQEMLVRSAIKYWVERHKHVVRLVTSVGDAYGVALLLHMLTTTITLTLLAYQATKVNGVNVYAATVIGYLLY  389

AcerOrco  SLGQVFMLCIFGNRLIEESSSVMEAAYSCHWYDGSEEAKTFVQIVCQQCQKAMSISGAKFFTVSLDLFASVLGAMVTYFMVLVQLK  478
AfloOrco  SLGQVFMLCIFGNRLIEESSSVMEAAYSCHWYDGSEEAKTFVQIVCQQCQKAMSISGAKFFTVSLDLFASVLGAMVTYFMVLVQLK  477
BimpOrco  SLGQVFMLCIFGNRLIEESSSVMEAAYSCHWYDGSEEAKTFVQIVCQQCQKAMSISGAKFFTVSLDLFASVLGAMVTYFMVLVQLK  479
CchlOrco  SLGQVFLFCIFGNRLIEESSSVMEAAYSCHWYDGSEEAKTFVQIVCQQCQKAMSISGAKFFTVSLDLFASVLGAVVTYFMVLVQLK  478
CcinOrco  TLGQVFLFCIFGNRLIEESSSVMEAAYSCHWYDGSEEAKTFVQIVCQQCQKAMSISGAKFFTVSLDLFASVLGAVVTYFMVLVQLK  481
HarmOrco  TLGQVFHFCIFGNRLIEESSSVMEAAYSCQWYDGSEEAKTFVQIVCQQCQKAMSISGAKFFTVSLDLFASVLGAVVTYFMVLIQLK  473
MmedOrco  SLGQVFLFCIFGNRLIEESSSVMEAAYSCHWYDGSEEAKTFVQIVCQQCQKAMSISGAKFFTVSLDLFASVLGAVVTYFMVLVQLK  477
NvitOrco  TLGQVFLFCIFGNRLIEESSSVMEAAYSCHWYDGSEEAKTFVQIVCQQCQKAMSISGAKFFTVSLDLFASVLGAVVTYFMVLVQLK  475
```

图 2 棉铃虫齿唇姬蜂与其他昆虫嗅觉受体共受体氨基酸序列比较

Fig. 2 Amino acid sequence alignment of Orco among *Campoletis chlorideae* and other insects

Orco 序列来源 Origin of Orco proteins: AcerOrco: 东方蜜蜂 *Apis cerana*; AfloOrco: *Apis florae*; BimpOrco: *Bombus impatiens*; CchlOrco: 棉铃虫齿唇姬蜂 *Campoletis chlorideae*; CcinOrco: 普通麦茎蜂 *Cephus cinctus*; HarmOrco: 棉铃虫 *Helicoverpa armigera*; MmedOrco: 中红侧钩茧蜂 *Microplitis mediator*; NvitOrco: 蝶蛹金小蜂 *Nasonia vitripennis*.

低,在头(去掉触角)和腹部未见表达(图 4)。

3 讨论

本研究从棉铃虫齿唇姬蜂触角中克隆出一个嗅觉受体共受体基因 *CchlOrco*,该基因全长为 1 437 bp,编码 478 个氨基酸;预测该氨基酸序列有 7 个 α 螺旋跨膜区,并且蛋白质的 N 端在细胞膜内,C 端在细胞膜外的亲水区,符合嗅觉受体共受体(Orco)亚家族基因的特征(Smart *et al*., 2008),这是在 NCBI

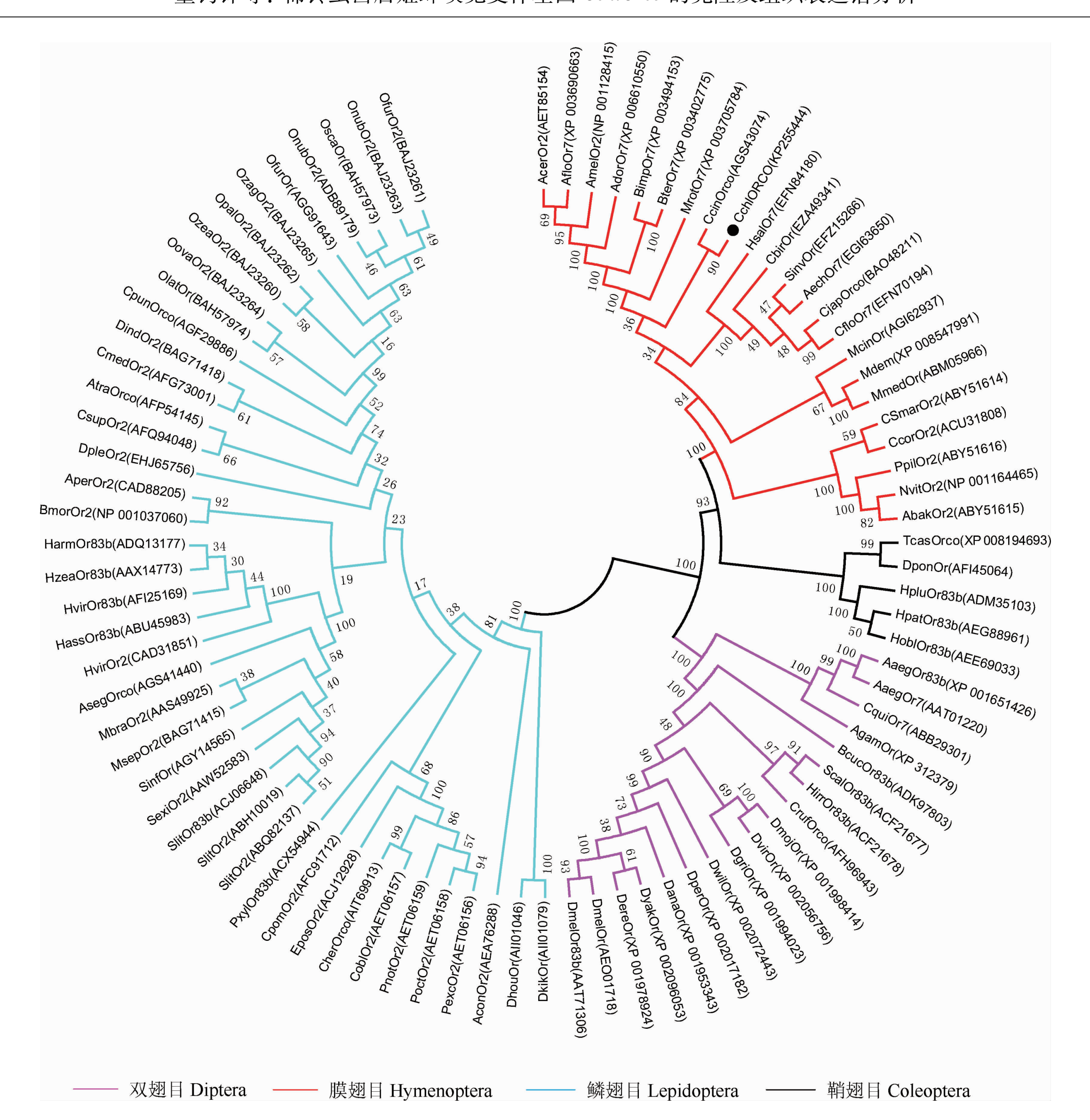


图 3　棉铃虫齿唇姬蜂与其他昆虫 Orco 氨基酸序列的系统进化树（邻接法）

Fig. 3　Phylogenetic tree of the Orco of *Campoletis chlorideae* and other insect species based on amino acid sequences (the neighbor-joining method)

括号外字母为基因名，括号内编号为基因登录号。The letters outside the brackets denote the gene names, while the numbers in the brackets denote GenBank accession numbers.

上登录的有关棉铃虫齿唇姬蜂的第一个嗅觉相关基因。通过与近缘昆虫和棉铃虫齿唇姬蜂的寄主棉铃虫 Orco 氨基酸序列比对，发现这类基因编码的蛋白质 C 末端序列高度保守，特别是在跨膜区 6－7 之间，除了 His/Gln，Met/Val 和 Val/Ile 3 个氨基酸位点不同外，其余完全一致。同样的结果在桃蛀螟 *Conogethes punctiferalis*（葛星等，2013）、中华蜜蜂（张林雅等，2012）、中红侧沟茧蜂（张帅等，2009）和冈比亚按蚊（Pitts *et al*., 2004）中也有发现。在黑腹果蝇中被证实这个保守的区域在传统受体 ORs 与 Orco 相互作用时起着非常重要的作用（Benton *et al*., 2006）；Jones 等（2005）研究证实 Orco 在不同目的昆虫中具有序列和功能的保守性，表明它们在昆虫嗅觉中扮演至关重要的角色，因此在利用 Orco 做靶标防治害虫时，一些寄生性天敌可能同时也会被干扰。通过与其他 4 个目 89 种昆虫 Orco 氨基酸序列进化树比较发现，随着昆虫几百万年的选择和进化，Orco 在不同昆虫间的亲缘关系也有所分歧，找到合适的 Orco 靶标位点，可能是以后利用 Orco 防治害虫的突破口。

Orco 主要在昆虫的触角和下颚须等嗅觉感器中表达（Larsson *et al*., 2004）。如中红侧沟茧蜂和

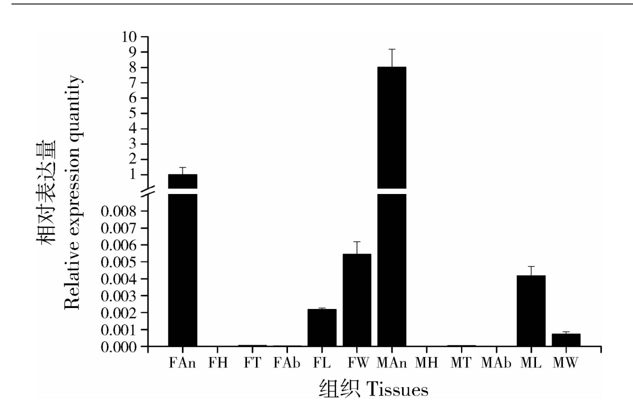


图 4 *CchlOrco* 在棉铃虫齿唇姬蜂成虫不同组织中的相对表达量

Fig. 4 Relative expression levels of *CchlOrco* in different tissues of *Campoletis chlorideae* adults

FAn：雌蜂触角 Female antennae；FH：雌蜂头（去掉触角）Female head (antennae removed)；FT：雌蜂胸 Female thorax；FAb：雌蜂腹 Female abdomen；FL：雌蜂足 Female leg；FW：雌蜂翅 Female wing；MAn：雄蜂触角 Male antennae；MH：雄蜂头（去掉触角）Male head (antennae removed)；MT：雄蜂胸 Male thorax；MAb：雄蜂腹 Male abdomen；ML：雄蜂足 Male leg；MW：雄蜂翅 Male wing.

斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 的 *Orco* 仅在触角中特异性表达(张帅等, 2009；Dong *et al*., 2013)；桃蛀螟的 *Orco* 主要在触角和下颚须中表达，并且在雄蛾触角中的表达量是雌蛾的 1.32 倍；甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* 的 *Orco* 在触角和喙中均有表达，且雄蛾表达量是雌蛾的 5.5 倍(张逸凡等, 2011)。本研究发现棉铃虫齿唇姬蜂的 Orco 基因 *CchlOrco* 主要在触角中表达，且在雄蜂触角中表达量是在雌蜂触角中表达量的 8.0 倍，雄蜂表达量高可能与其通过嗅觉识别雌蜂释放的性信息素进行交配有关。*CchlOrco* 在触角中大量表达是容易理解的，因为成虫触角上分布着大量的嗅觉感器，而且是成虫交配、产卵及寄主选择的主要嗅觉器官。埃及伊蚊和致倦库蚊 *Culex quinquefasciatus* 的 *Orco* 除在主要嗅觉器官触角、下颚须中高量表达外，在喙和足中也有表达(Melo *et al*., 2004；Xia and Zwiebel, 2006)；传粉榕小蜂 *Ceratosolen solmsi* 除触角外，在足和腹部也检测到 *Orco* 的表达，另外，在 3 种非传粉榕小蜂 *Apocrypta bakeri*, *Philotrypesis pilosa* 和 *Philotrypesis* sp. 的胸部也检测到 *Orco* 的表达(Lu *et al*., 2009)；中华蜜蜂在采集蜂时期触角、头(去掉触角)、胸腹和翅中均有表达(张林雅等, 2012)，而 *CchlOrco* 在足和翅中也有少量表达，目前关于 Orco 基因在除触角外其他组织中的表达原因还不是很清楚，或许 Orco 除嗅觉功能外还有其他功能。

本研究克隆了棉铃虫齿唇姬蜂受体基因 *CchlOrco*，并对该基因在不同组织中的表达情况进行了分析，为进一步研究 Orco 及其他 ORs 的功能奠定了基础。

参考文献(References)

Benton R, Sachse S, Michnick SW, Vosshall LB, 2006. A typical membrane topology and heteromeric function of *Drosophila* odorant receptors in vivo. *PLoS Biol*., 4(2): e20.

Chen QS, Jiang XJ, Ju Q, Zhao ZQ, Qu MJ, Zhu XC, 2010. Molecular cloning and sequence analysis of odorant receptor gene *Or83b* in *Holotrichia plumbea*. *Acta Agric. Jiangxi*, 22(11): 1-4. [陈全森，姜晓静，鞠倩，赵志强，曲明静，朱新产，2010. 农业害虫铅灰齿爪鳃金龟气味受体基因 *Or83b* 的克隆及序列分析. 江西农业学报，22(11): 1-4]

Chen SS, Luetje CW, 2012. Identification of new agonists and antagonists of the insect odorant receptor co-receptor subunit. *PLoS ONE*, 7(5): e36784.

Dong XL, Zhang GH, Hu MY, Yi X, Zhao HM, Wang HD, 2013. Molecular cloning and functional identification of an insect odorant receptor gene in *Spodoptera litura* (F.) for the botanical insecticide rhodojaponin III. *J. Insect Physiol*., 59(1): 26-32.

Ge X, Zhang TT, He KL, Wang QY, Li YL, Wang ZY, 2013. Cloning and tissue expression profiling of the olfactory receptor coreceptor gene in adults of *Conogethes punctiferalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Acta Entomol. Sin*., 56(3): 243-250. [葛星，张天涛，何康来，王勤英，李云龙，王振营，2013. 桃蛀螟成虫 Orco 嗅觉受体基因的克隆及组织表达谱分析. 昆虫学报，56(3): 243-250]

Hallem EA, Ho MG, Carlson JR, 2004. The molecular basis of odor coding in the *Drosophila* antenna. *Cell*, 117(7): 965-979.

Jones PL, Pask GM, Romaine IM, Taylor RW, Reid PR, Waterson AG, Sulikowski GA, Zwiebel LJ, 2012. Allosteric antagonism of insect odorant receptor ion channels. *PLoS ONE*, 7(1): e30304.

Jones WD, Nguyen TAT, Kloss B, Lee KJ, Vosshall LB, 2005. Functional conservation of an insect odorant receptor gene across 250 million years of evolution. *Curr. Biol*., 15(4): R119-R121.

Krieger J, Klink O, Mohl C, Raming K, Breer H, 2003. A candidate olfactory receptor subtype highly conserved across different insect orders. *J. Comp. Physiol. A*, 189(7): 519-526.

Larsson MC, Domingos AI, Jones WD, Chiappe ME, Amrein H, Vosshall LB, 2004. *Or83b* encodes a broadly expressed odorant receptor essential for *Drosophila* olfaction. *Neuron*, 43(5): 703-714.

Liu WX, Wan FH, Yuan ST, 2004. Mass-rearing and bionomics of *Campoletis chlorideae*. *Chinese Journal of Biological Control*, 20(1): 17-20. [刘万学，万方浩，苑士涛，2004. 棉铃虫齿唇姬蜂的饲养及生物学特性. 中国生物防治，20(1): 17-20]

Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods*, 25(4): 402-408.

Lu B, Wang NN, Xiao JH, Xu YY, Murphy RW, Huang DW, 2009. Expression and evolutionary divergence of the non-conventional olfactory receptor in four species of fig wasp associated with one species of fig. *BMC Evol. Biol.*, 9(1): 43.

Lundin C, Käll L, Kreher SA, Kapp K, Sonnhammer EL, Carlson JR, Heijne G, Nilsson I, 2007. Membrane topology of the *Drosophila* OR83b odorant receptor. *FEBS Letters*, 581(29): 5601 – 5604.

Melo ACA, Rützler M, Pitts RJ, Zwiebel LJ, 2004. Identification of a chemosensory receptor from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*, that is highly conserved and expressed in olfactory and gustatory organs. *Chem. Senses*, 29(5): 403 – 410.

Nakagawa T, Sakurai T, Nishioka T, Touhara K, 2005. Nandihalli BS, Lee JH, 1995. Seasonal occurrence of *Campoletis chlorideae* Uchida and its control efficacy on the oriental tobacco budworm, *Helicoverpa assulta* (Guenee), in tobacco fields in Suwon. *Korean J. Appl. Entomol.*, 34(2): 147 – 153.

Pandey P, Kumar N, Tripathi CPM, 2004. Impact of males on the progeny sex ratio of *Campoletis chlorideae* (Hym., Ichneumonidae), a parasitoid of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lep., Noctuidae). *J. Appl. Entomol.*, 128(4): 254 – 257.

Pitts RJ, Fox AN, Zwiebel LJ, 2004. A highly conserved candidate chemoreceptor expressed in both olfactory and gustatory tissues in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101(14): 5058 – 5063.

Qiao Q, Li HC, Yuan GH, Guo XR, Luo MH, 2010. Cloning and expression analysis of cDNA encoding Or83b-like receptor from *Helicoverpa assulta*. *Agric. Sci. China*, 9(7): 1001 – 1007.

Qiao Q, Yuan GH, Li HC, Guo XR, Luo MH, 2008. Research advances in odorant receptors in insects. *Acta Entomol. Sin.*, 51(1): 75 – 80. [乔奇，原国辉，李海超，郭线茹，罗梅浩，2008. 昆虫气味受体研究进展. 昆虫学报，51(1): 75 – 80]

Sakurai T, Nakagawa T, Mitsuno H, Mori H, Endo Y, Tanoue S, Yasukochi Y, Touhara K, Nishioka T, 2004. Identification and functional characterization of a sex pheromone receptor in the silkmoth *Bombyx mori*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101(47): 16653 – 16658.

Shen JM, Hu LM, Bin SY, Lin JT, 2011. Cloning and expression profiling of an olfactory receptor gene in *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) (Diptera: Tephritidae). *Acta Entomol. Sin.*, 54(3): 265 – 271. [申建梅，胡黎明，宾淑英，林进添，2011. 瓜实蝇嗅觉受体基因的克隆及表达谱分析. 昆虫学报，54(3): 265 – 271]

Smart R, Kiely A, Beale M, Vargas E, Carraher C, Kralicek AV, Christie DL, Chen C, Newcomb RD, Warr CG, 2008. *Drosophila* odorant receptors are novel seven transmembrane domain proteins that can signal independently of heterotrimeric G proteins. *Insect Biochem. Molec.*, 38(8): 770 – 780.

Steinbrecht RA, 1997. Pore structures in insect olfactory sensilla: a review of data and concepts. *Int. J. Insect Morphol. Embryol.*, 26(3/4): 229 – 245.

Vogt RG, Riddiford LM, 1981. Pheromone binding and inactivation by moth antennae. *Nature*, 293: 161 – 163.

Vosshall LB, Amrein H, Morozov PS, Rzhetsky A, Axel R, 1999. A spatial map of olfactory receptor expression in the *Drosophila* antenna. *Cell*, 96(5): 725 – 736.

Vosshall LB, Hansson BS, 2011. A unified nomenclature system for the insect olfactory coreceptor. *Chem. Senses*, 36(6): 497 – 498.

Wang GR, Wu KM, Guo YY, 2004. Research advance on molecular mechanism of odors perception in insects. *J. Agric. Biotechnol.*, 12(6): 720 – 726. [王桂荣，吴孔明，郭予元，2004. 昆虫感受气味物质的分子机制研究进展. 农业生物技术学报，12(6): 720 – 726]

Xia YF, Zwiebel LJ, 2006. Identification and characterization of an odorant receptor from the West Nile Virus mosquito, *Culex quinquefasciatus*. *Insect Biochem. Molec.*, 36(3): 169 – 176.

Zhang LY, Xie BH, Ni CX, Zhao L, Li HL, Shang HW, 2012. Cloning, expression and subcellular localization of the olfactory coreceptor Orco gene in the Chinese honeybee, *Apis cerana cerana* (Hymentoptera: Apidae). *Acta Entomol. Sin.*, 55(11): 1246 – 1254. [张林雅，谢冰花，倪翠侠，赵磊，李红亮，商晗武，2012. 中华蜜蜂 Orco 嗅觉受体基因的克隆、表达及亚细胞定位. 昆虫学报，55(11): 1246 – 1254]

Zhang S, Zhang YJ, Su HH, Gao XW, Guo YY, 2009. Gene cloning and tissue-specific expression of an olfactory receptor in *Microplitis mediator* (Hymenoptera: Braconidae). *Sci. Agric. Sin.*, 42(5): 1639 – 1645. [张帅，张永军，苏宏华，高希武，郭予元，2009. 中红侧沟茧蜂非典型气味受体的克隆及组织特异性表达. 中国农业科学，42(5): 1639 – 1645]

Zhang YF, Xiu WM, Yang DL, Dong SL, Liu YS, 2011. Tissue-specific expression and temporal and spatial expression of atypical odorant receptor gene *OR2* in *Spodoptera exigua* (Hübner). *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 27(7): 231 – 235. [张逸凡，修伟明，杨殿林，董双林，刘玉升，2011. 甜菜夜蛾非典型嗅觉受体基因 *OR2* 的组织特异性和时空表达. 中国农学通报，27(7): 231 – 235]

（责任编辑：袁德成）